

## **Дифференциация маркеров нейродегенерации (Аβ40, Аβ42, PrP<sub>27-30</sub>) при болезни Альцгеймера и прионных заболеваниях на сконструированных кремниевых биочипах**

А.Н. Асташонок<sup>1</sup>, Г.К. Жавнерко<sup>2</sup>, Л.В. Рубаник<sup>1</sup>, Т.В. Докукина<sup>3</sup>, Н.Н. Полещук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», 220114, Минск, Беларусь  
micro.87@mail.ru

<sup>2</sup>Учреждение образования «Институт ИТ и бизнес-администрирования», 220040, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», 220053, Минск, Беларусь

В работе представлены результаты экспериментальных исследований по конструированию нанотехнологических платформ для управляемой адсорбции, детекции и идентификации с использованием атомно-силовой микроскопии маркеров нейродегенерации – β-амилоидов Аβ40, Аβ42, прионного PrP<sub>27-30</sub> белка. Полученные результаты важны для оценки степени выраженности дегенеративно-дистрофических изменений в ЦНС, усовершенствования методов диагностики и прогнозирования скорости развития патологического процесса в зависимости от концентрации и конформационной структуры амилоидогенных белков.

## **Differentiation markers of neurodegeneration (Aβ40, Aβ42, PrP<sub>27-30</sub>) in Alzheimer's disease and prion diseases on the designed silicon biochips**

A.N. Astashonok<sup>1</sup>, G.K. Zhavnerko<sup>2</sup>, L.V. Rubanik<sup>1</sup>, T.B. Dokukina<sup>3</sup>, N.N. Poleshchuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, 220114, Minsk, Belarus

<sup>2</sup>Institute of IT and Business Administration, 220040, Minsk, Belarus

<sup>3</sup>Republican Research and Practice Center for Mental Health, 220053, Minsk, Belarus

The article presents the experimental results on design of nanotechnological platforms for controlled adsorption, detection and identification using atomic force microscopy markers of the neurodegeneration – β-amyloids Aβ40, Aβ42, prion PrP<sub>27-30</sub> protein. The obtained results are important for assessing the severity of degenerative-dystrophic changes in the central nervous system, improving the methods for diagnosis and predicting the rate of development of the pathological process, depending on the concentration and conformational structure of amyloidogenic proteins.

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) с развитием амилоидоза в ЦНС являются одной из значимых медико-социальных проблем, обуславливающих высокую частоту инвалидизации и смертности [1]. Наиболее распространенным НДЗ является болезнь Альцгеймера (БА), которая превалирует как у лиц пожилого (64-70 лет), так и старческого возраста (80-90 лет) [2].

**Цель работы.** Используя АСМ-анализ разработать тактику детекции и идентификации белков (Аβ40, Аβ42, PrP<sub>27-30</sub>), образующихся при развитии специфических дистрофических изменений в ЦНС.

**Материалы и методы.** Использовали штаммы прионного PrP<sub>27-30</sub> белка: скрепи (шт. 263К, Франция), БКЯ (шт. БКЯ-ДВ, РБ) и коммерческие β-амилоидные белки: Аβ40, Аβ42 (Abscam). Штаммы PrP<sub>27-30</sub> предварительно накапливали *in vivo*, готовили серию из 30 аликвот (разведение 1:100 – 1:1000) и обрабатывали протеиназой К по способу [3,4]. β-амилоиды предварительно разводили 50 мМ Трис-буферным раствором (рН 7,0) до концентрации 50 мкг/мл. Полученные фракции наносили на сенсорную кремниевую поверхность, полученную по способу [5], с экспозицией образцов 60, 80, 120, 180, 220 мин. Анализ проводили на микроскопе Nanoscope IIIa MultiMode (Digital Instruments,

Santa Barbara, США). Использовали 100- и 200-мкм микрозонды «Nanoprobe» (Veeco, США) из  $\text{Si}_3\text{N}_4$  с константами упругости 0,12 и 0,36 Н/м и тейпинговые иглы из кремния с резонансной частотой ~315 кГц.

**Результаты исследования.** На первоначальном этапе были сконструированы специфические сенсорные покрытия. Схема их получения представлена на рисунке 1.

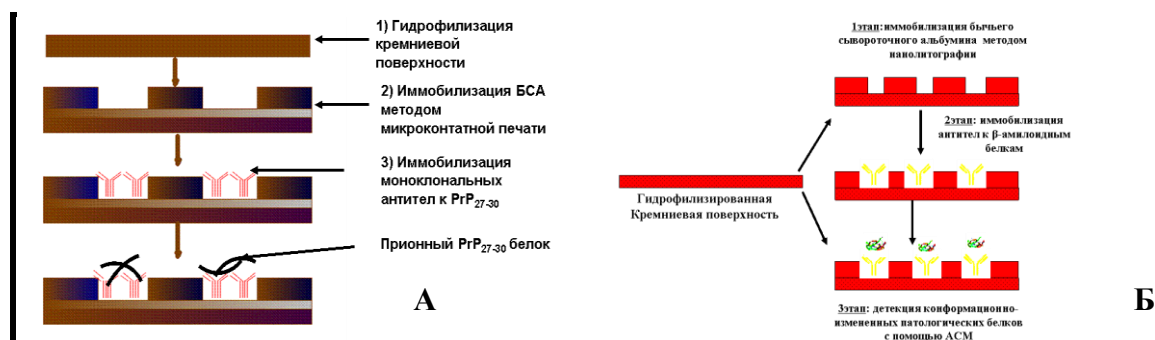


Рисунок 1. Схема конструирования сенсорных покрытий для детекции белков (А – PrP<sub>27-30</sub>, Б – β-амилоидов) с помощью АСМ.

На следующем этапе для изучения тонкой структурной организации проводили иммобилизацию на полученную сенсорную поверхность различных патологических белков. С помощью АСМ описаны этапы полимеризации β-амилоидов и PrP<sub>27-30</sub> (рис. 2). Установлено, что образование протофибрилл (Аβ40, Аβ42) происходит из множества мономерных частиц (2-3 нм), которые соединялись друг с другом, превращаясь в округлые олигомеры (ширина –  $79,2 \pm 17,4$  нм, высота  $4,3 \pm 2,2$  нм). Последние далее агрегировали в различного типа протофибриллярные структуры (от 350 до 500 нм).

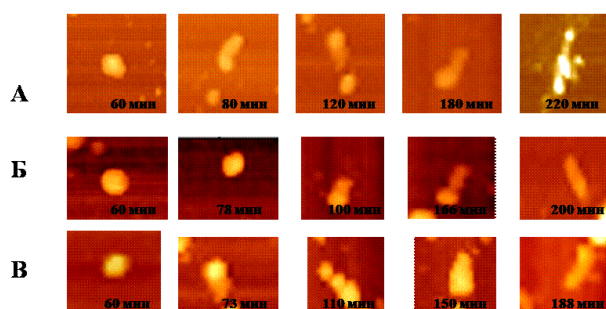


Рисунок 2. Этапы полимеризации амилоидных пептидов Аβ40 (А, Б), Аβ42 (В) на кремниевой поверхности.

Сходный тип белковых структур отмечен при исследовании прионного белка. Показано, что на подложках выявлялись два типа частиц: глобулы (ширина 5-12 нм, высота – 4-5 нм) и префибриллярные структуры (размером 200-300 нм, высота – 5-7 нм), сходные с протофибриллами, наблюдаемыми при полимеризации Аβ40, Аβ42.

Таким образом, на сконструированных биочипах показана возможность детекции патологических белковых компонентов различного генеза.

1. В.Ю. Лобзин, М.М. Одинак, *Неврология* **14**, 1085 (2013).
2. C. Reitz, C. Brayne, *Nat. Rev. Neurol.* **3**, 137 (2013).
3. K. Hoglund, H. Salter, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **8**, 845 (2013)
4. A. Wenborn, *Scientific Reports* **5**, 10062 (2015).
5. А.Н. Асташонок, *Психиатрия, психотерапия и клиническая психология* **2**, 11 (2015).